

도깨비 부채 뿌리 추출물의 피부 과다색소침착에 미치는 영향

공연희 · 이평재* · 최상윤†

한국식품연구원, *세명대학교 자연약재과학과

Action of *Rodgersia podophylla* Root Extracts on Melanin Biosynthesis in Skin

Yeon Hee Kong, Pyeongjae Lee*, and Sang Yoon Choi†

Korea Food Research Institute, Songnam 463-746, Korea.

*Department of Natural Medicine Resources, Semyung University, Jecheon 390-711, Korea.

ABSTRACT : In the previous study, we reported the inhibitory effects of *Rodgersia podophylla* root extract on tyrosinase activity and melanin production in melan-a cells. However, mechanism of the inhibitory activity and *in vivo* assay were not yet examined. This study performed the examination of the effects of *Rodgersia podophylla* root extract on protein expression and *in vivo* depigmenting activity using melan-a cells and brown guinea pigs. As the results of western immunoblotting analysis, treatment of *Rodgersia podophylla* root extract reduced tyrosinase expression rates in 10 and 100 ppm concentrations, dose dependently. Moreover, *Rodgersia podophylla* root extract exhibited depigmenting activity on UV-B induced hyperpigmentation in brown guinea pig skin. These results suggested that *Rodgersia podophylla* root extract could act as whitening agent for the skin via not only direct tyrosinase activity inhibition but also reducing of tyrosinase expression.

Key Words : *Rodgersia podophylla*, melanogenesis, brown guinea pig

서 언

피부의 색은 멜라닌, 헤모글로빈, 카로틴의 양 등에 의하여 결정되며 주된 요인은 피부 내 멜라닌의 생성량 및 분포 정도이다 (Lin *et al.*, 2007; Chun *et al.*, 2001). 멜라닌은 표피의 기저층에 주로 존재하는 melanocyte에서 주로 생성되며 melanosome이라는 세포 소기관에서 이루어진다 (Solminski *et al.*, 2004; Cardinali *et al.*, 2005). Melanocyte는 자외선, 염증 등에 의하여 활성화되어 멜라닌 생성이 증가되며 생성된 멜라닌은 피부를 보호하는 역할을 하나 이의 과생성은 기미, 주근깨, 검은반점 등의 피부질환을 일으킨다 (Miyamura *et al.*, 2006; Sulaimon *et al.*, 2003). 따라서 멜라닌의 과다생성을 억제하는 소재에 대한 연구가 활발히 진행되어 코지산, 비타민 유도체, 알부틴 등이 도출 되어졌으나 코지산은 임상적 효과가 높지 않고 비타민 유도체는 안정성에 문제가 있는 실정으로 인해 (Parvez *et al.*, 2006) 최근에는 이의 대체 소재로써 천연자원을 이용한 미백소재에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 본 연구자는 이미 미백활성이 보고되지 않은 새로운 천연자원인 도깨비 부채 뿌리 추출물의 tyrosinase 억제 활성 및 자외선 차단효과, 멜라닌 생성세포에서의 멜라닌 생성

억제효과 등을 발견하여 보고한 바 있다 (Choi *et al.*, 2006). 도깨비 부채는 경기도 이북지역에 자생하는 범의귀과 여러해살이풀로써 bergenin, flavonol glycoside, lignan 등이 함유되어있는 자생식물자원이다. (Chin and Kim, 2004; Chin *et al.*, 2004). 이번 연구에서는 도깨비 부채 뿌리 추출물의 색소 억제 기전 및 생체상에서의 활성을 검증하기 위해 멜라닌 생성 세포에서의 tyrosinase 및 dopachrome tautomerase (TRP-2) 발현량, UV로 유도된 brown guinea pig 피부의 과다색소 침착에 미치는 영향 등을 측정하였고 이의 활성을 확인하여 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 시료의 조제

2004년 경기도 포천에서 채취한 도깨비 부채를 경희대학교 한의과 대학 본초학 교실에서 검정을 받아 사용하였다. 도깨비 부채 뿌리 부분을 분리하여 세척 후 건조하여 분쇄하고 메탄올을 이용하여 1시간씩 3회 상온에서 초음파 추출하였다. 얻어진 추출액을 여과 후 감압 농축하여 얻어진 잔사 (수율 : 4.0%)를 -20°C에 보관하면서 시료로 사용하였다.

†Corresponding author: (Phone) +82-31-780-9307 (E-mail) sychoi@kfri.re.kr
Received October 23, 2007 / Accepted December 1, 2007

2. 세포배양

마우스 유래의 멜라닌 생성세포인 Melan-a 세포를 37°C, 5% CO₂ 조건에서 10% fetal bovine serum (Gibco BRL, USA)과 1% penicillin-streptomycin (Gibco BRL, USA), 200 nM의 Phorbol-12 myristate 13-acetate (Sigma-Aldrich co. USA) 가 함유된 RPMI 1640 배지 (Gibco BRL, USA) 를 사용하여 배양하였다 (Hwang *et al.*, 2006)

3. 세포내 단백질의 추출

Culture dish (100 mm)에 1 × 10⁶ 개의 세포를 접종하고 24시간 동안 배양한 후 용매 (propylenen glycol / EtOH / H₂O = 5 / 3 / 2)에 녹인 시료를 100 ppm 농도로 하루에 한번씩 새로운 배지와 함께 3일간 처리하였다. 마지막 시료 처리 24시간 후 배지를 제거하고 PBS로 세척 후 세포를 수집하여 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.02% sodium azide, 100 µg/ml PMSF, 1 µg/ml aprotinin) 로 단백질을 추출하였다.

4. Tyrosinase 및 TRP-2 발현량 측정

Melan-a 세포로부터 추출된 단백질 50 µg을 8% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동 한 후 membrane에 옮기고 5% skim milk로 blocking 하였다. 이것을 tyrosinase와 TRP-2의 1차 antibody 와 각각 반응시키고 다시 anti-goat 2차 antibody 를 반응시켜 ECL로 검출하였다.

6. 실험동물

본 연구에서는 450 g 정도의 brown guinea pig 암컷을 Shizuoka co. (일본) 으로부터 구입하여 항온, 항습이 유지되는 실험동물실에서 사육하며 사용하였다.

7. UV-B로 유도된 brown guinea pig 피부의 색소침착에 대한 효과

Brown guinea pig의 등 부분을 제모 후 구역을 나누어 280-320 nm UV-B lamp (Sankyo Denki co. Japan)를 사용하여 일주일 간격으로 총 3회 500 mJ/cm²의 UV-B 를 조사하여 피부 색소 침착을 유발하였다. 색소침착이 유발된 각각의 부위에 세척 후 1일 1회 70% 에탄올에 녹인 시료를 도포하고 피부색의 변화를 6주간 관찰 하였고 변화량은 chromameter (CR-300, Minolta, Japan) 를 사용하여 측정하여 L-value로 나타내었다 (Ando *et al.*, 1998).

8. 통계방법

각 실험결과는 평균 ± 표준편차로 표시하였으며 유의성 검정은 Student's *t*-test를 이용하였다.

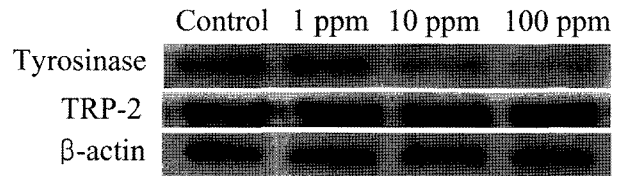


Fig. 1. Effects of *Rodgersia podophylla* root extract on intracellular level of tyrosinase and TRP-2 in melan-a cells. Protein was detected using western blot analysis at three days after.

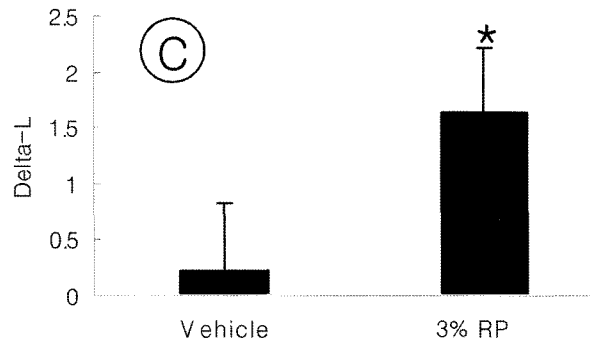
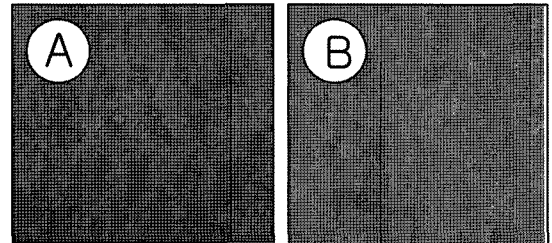


Fig. 2. Depigmenting Effects of *Rodgersia podophylla* root extract on hyperpigmentation in brown guinea pig skin. Six weeks after daily topical application of *Rodgersia podophylla* root extract (RP). A: 70% ethanol treated skin site (Vehicle). B: 3% RP in 70% ethanol treated skin site. C: The degree of pigmentation decrease (Δ -value).

결과 및 고찰

1. 세포내 단백질 발현에 미치는 영향

앞서의 연구결과에 따라 (Choi *et al.*, 2006) Melan-a 세포에서 세포독성 없이 멜라닌 생성량을 유의적으로 감소시킨 도깨비 부채 뿌리 추출물 시료를 Melan-a 세포에 3일간 처리하고 단백질을 추출하여 멜라닌 생성성 과정에 중요한 역할을 하는 효소인 tyrosinase 및 TRP-2 (Aroca *et al.*, 1993; Pawelek, 1991) 의 발현량을 western immunoblotting 하여 정량한 결과 도깨비 부채 뿌리 추출물은 100 ppm 농도에서 tyrosinase 발현량을 감소시켰고 TRP-2 발현량은 모든 농도에서 변화가 없었다. 따라서 도깨비 부채 뿌리 추출물은 멜라닌 생성성 경로에서 초기에 관여하는 tyrosinase의 활성을 직접적

으로 억제할 뿐만 아니라 (Choi *et al.*, 2006) 세포 내 tyrosinase 발현량을 줄임으로써 멜라닌 생성량을 감소시키는 것으로 판단된다.

2. UV-B로 유도된 brown guinea pig 피부의 색소침착에 미치는 영향

도깨비 부채 뿌리의 *in vivo* 상의 활성을 검정하기 위해 brown guinea pig의 피부에 UV를 이용하여 색소 침착을 유도하고 도깨비 부채 뿌리 추출물을 6주간 매일 도포하여 피부 색의 변화 및 자극성 여부를 측정된 결과 3% 농도로 도포된 피부 부위에서 4주 후부터 vehicle 대비 피부색의 완화 효과가 나타났으며 모든 실험기간 동안 피부발적 및 이상 현상은 관찰되지 않았다.

적 요

멜라닌 생합성은 tyrosinase의 작용으로 인한 tyrosine의 산화로부터 시작되어 dopaquinone 및 dopachrome가 생성되고 dopachrome는 다시 dihydroxyindole과 dopachrome tautomerase에 의한 dihydroxyindole-2-carboxylic acid로 전환되는 과정을 거쳐 진행된다 (Alaluf *et al.*; 2001). 도깨비 부채 뿌리 추출물의 멜라닌 생합성 저해 기전을 검정하기 위하여 melan-a 세포에서의 tyrosinase 및 TRP-2 발현량을 western immunoblotting 하여 측정된 결과 도깨비 부채 뿌리 추출물은 TRP-2 발현량에는 영향을 미치지 않으나 tyrosinase의 발현량을 현저히 감소시킴을 확인 할 수 있었고 따라서 이전의 연구와 종합하여 볼 때 도깨비 부채 뿌리 추출물은 멜라닌 생합성의 초기에 주요한 역할을 하는 tyrosinase의 활성 및 발현을 모두 억제함으로써 멜라닌 생성을 감소시키는 것으로 사료된다. 또한 도깨비 부채 뿌리 추출물은 brown guinea pig 피부에서 3% 농도로 도포 시 발적이나 이상 징후를 일으키지 않고 자외선으로 유도된 색소 침착을 감소시켜 피부 미백 용도의 기능성 원료로써 큰 가능성을 가지고 있는 것으로 판단된다.

사 사

본 연구는 농림부 농림기술개발사업의 지원 및 한국식품연구원 연구사업의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

LITERATURE CITED

Alaluf S, Heath A, Carter N, Atkins D, Mahalingam H, Barrett K, Kolb R, Smit N (2001) Variation in melanin content and composition in type V and VI photoexposed and photoprotected human skin: the dominant role of DHI. *Pigment Cell Res.* 14:337-347.

Ando H, Ryu A, Hashimoto A, Oka M, Ichihashi M (1998) Linoleic acid and α -linolenic acid lightens ultraviolet-induced hyperpigmentation of the skin. *Arch. Dermatol. Res.* 290:375-381.

Aroca P, Urabe K, Kobayashi T, Tsukamoto K, Hearing VJ (1993) Melanin Biosynthesis Patterns following Hormonal Stimulation. *J. Biol. Chem.* 268:25650-25655.

Cardinalli G, Ceccarelli S, Kovacs D, Aspite N, Lotti LV, Torrisi MR, Picardo M (2005) Keratinocytes growth factor promotes melanosome transfer to keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 125: 1190-1199.

Chin YW, Kim JW (2004) Four novel lignans from *Rodgersia podophylla*. *Tetrahedron Letters.* 45:339-341.

Chin YW, Lim SW, Kim YC, Choi SZ, Lee KR, Kim J (2004) Hepatoprotective flavonol glycosides from the aerial parts of *Rodgersia podophylla*. *Planta Med.* 70:576-577.

Choi SY, Kang NJ, Kim HC (2006) Inhibitory effects of root extracts on melanin biosynthesis in *rodgersia podophylla* A. gray. *J. Medicinal Crop Sci.* 14(1):27-30.

Chun HJ, Choi EY, Yoon SC, Nam HW, Beak SH, Woo WH (2001) Inhibitory effects of ethanol extract of *atractylodis rhizome alba* on melanin biosynthesis. *Yakhak Hoeji* 45(3): 269-275.

Hwang EY, Choi SY (2006) Quantitative analysis of phenolic compounds in different parts of panax ginseng C.A. Meyer and its inhibitory effect on melanin biosynthesis. *J. Medicinal Crop Sci.* 14(3):148-152.

Lin JY, Fisher DE (2007) Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* 445:843-850.

Miyamura Y, Coelho SG, Wolber R, Miller SA, Wakamatsu K, Zmudzka BZ, Ito S, Smuda C, Passeron T, Choi W, Batzer J, Yamaguchi Y, Beer JZ, Hearing VJ (2006) Regulation of human skin pigmentation and responses to ultraviolet radiation. *Pigment Cell Res.* 20:2-13.

Parvez S, Kang M, Chung HS, Cho C, Hong MC, Shin MK, Bae H (2006) Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. *Phytother. Res.* 20:921-934.

Pawelek JM (1991) After dopachrome? *Pigment Cell Res.* 4:53-62.

Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J (2004) Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol. Rev.* 84:1155-1228.

Sulaimon SS, Kitchell BE (2003) The biology of melanocytes. *Veterinary Dermatology* 14:57-65